

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 534号	学位授与年月日	平成21年 3月18日
氏 名	船 橋 伸 司		
論文題目	<p>Differential expression patterns of messenger RNAs encoding Nogo receptors and their ligands in the rat central nervous system. (ラット中枢神経系における Nogo 受容体とそのリガンドの mRNA 発現分布の差異)</p>		

博士(医学) 船 橋 伸 司

論文題目

Differential expression patterns of messenger RNAs encoding Nogo receptors and their ligands in the rat central nervous system

(ラット中枢神経系における Nogo 受容体とそのリガンドの mRNA 発現分布の差異)

論文内容の要旨

[はじめに]

整形外科診療上の課題のひとつとして、脊髄の外傷、変性疾患などの中枢神経障害で引き起こされた神経症状に対して根本的な治療法がないことが挙げられ、中枢神経の再生を可能にする治療法の開発が切に求められている。中枢神経系で特異的に軸索再生が強く制限されるメカニズムにはNogo-A、myelin-associated glycoprotein (MAG)、oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp)のようなミエリン由来の軸索再生阻害因子が関与していることが報告されている。また、これらの軸索再生阻害因子のレセプターとしてNogo-66 receptor (NgR1)が知られており、そのホモログであるNgR2およびNgR3についても軸索再生阻害への機能的関与が推察されている。これまでに中枢神経系でのNgR1-3、Nogo-A、MAG、OMgpの発現分布に関する報告は散見されるが、それは限られた領域においての研究であり、これらのレセプターとリガンドがどのように軸索再生阻害に関与するかは明らかになっていない。よって、本研究では中枢神経障害に対する効果的な治療法の開発に必須である基礎的知見を集積するため、ラット中枢神経系におけるNgR1-3、Nogo-A、MAG、OMgpのmRNA発現分布を広範かつ詳細に検討し、これらの因子の軸索再生阻害に対する機能的関与を推察した。

[材料ならびに方法]

検体は7週齢Wistar系雄性ラット(n=6)を使用した。麻酔下に脳、脊髄を採取し、凍結後20 μmの厚さで冠状断面の切片を作成した。NgR1-3、Nogo-A、MAG、OMgpの各mRNAを特異的に認識するオリゴヌクレオチドプローブを作成し、 $[^{35}\text{S}]\text{dATP}$ にて標識した。これらのプローブを用いて常法により*in situ* hybridizationを行った。mRNA発現の信号強度をS/N比に従って4段階に分類し、脳全体の発現分布を検討した。

[結果]

NgR1-3のmRNAは終脳、間脳、小脳などの非常に限局した領域で発現しており、中脳、橋、延髄、脊髄などの下位の部分では発現が認められなかった。NgR1-3 mRNAは灰白質のみに発現が見られたことから、ニューロンで発現していると考えられた。NgR1-3の発現パターンには多様性が見られ、各々の領域ごとあるいは細胞ごとに異なる発現の組み合わせが見られた。また、海馬の錐体細胞や大脳皮質の錐体細胞などのいわゆる投射ニューロンではNgR1-3すべてのmRNA発現が見られたが、海馬の介在ニューロンやモノアミン作動性ニューロン、視床網様核のGABAニューロンでは、NgR1-3 mRNAの発現が見られなかった。一方、Nogo-A mRNAは脳全体で灰白質、白質を問わず豊富にシグナルが観察され、ニューロンとオリゴデンドロサイト両者に発現していることが明らかとなった。また、MAG mRNAとOMgp mRNAは脳全体にわたって脳梁や内包などの白質で強く発現しており、両者はほとんど同様の発現分布を示していた。明視野による観察の結果、MAG mRNA、OMgp mRNAは脳全体のオリゴデンドロサイトに発現していることが明らかとなった。

[考察]

Nogo-A、MAG、OMgpのmRNAが脳全体に幅広く存在しているのと対照的に、NgR1-3のmRNAは非常に限局した領域にしか発現していなかった。海馬の錐体細胞や大脳皮質の錐体細胞などのいわゆる投射ニューロンでNgR1-3すべてのmRNA発現が見られたことから、正確な投射を保つために3者のレセプターが必要である可能性が考えられた。一方、海馬の介在ニューロンでは全くNgR mRNAが検出されず、NgR mRNAの発現を欠くことが、この部分での可塑性を保つために必要であると考えられた。また、高い再生能を持つとされているモノアミン作動性ニューロンや視床網様核のGABAニューロンでもNgR1-3 mRNAの発現が見られなかったが、これは軸索再生阻害がNgR1-3 mRNAの発現によって調節されているためであると考えられた。ニューロンでのNgR1-3 mRNAの発現には様々なレセプター発現の組み合わせが見られ、その組み合わせによって、リガンドに対して異なった反応を示す可能性が示唆された。

[結論]

NgR1-3、Nogo-A、MAG、OMgp mRNAはラット中枢神経系において多様な発現分布を示していた。また、ニューロンにおけるNgR1-3の発現レベルがその再生能を規定している可能性が示唆された。このような各々のニューロンが呈する再生能を十分考慮に入れて、そのメカニズムを解明していくことが、神経再生治療を進めていく上で有効であると思われる。

論文審査の結果の要旨

成人中枢神経では軸索再生が強く制限されており、そのメカニズムには Nogo-A、myelin-associated glycoprotein (MAG)、oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp)などのミエリン由来の軸索再生阻害因子が関与していることが知られている。中枢神経の恒常性を考慮すると軸索再生が制限されていることは目的にかなっているが、脊髄損傷の治療などを考えると不都合な現象といえる。これまでの研究で Nogo-A は脳全体で広範に発現しているのに対し、Nogo-A のレセプターとして知られている Nogo-66 receptor (NgR1) の発現領域は限局していることが分かっており、中枢神経の軸索再生は NgR1 により制御されていると考えられる。近年、NgR1 のホモログである NgR2、3 の存在も明らかになり、その機能が研究されている。これまでに中枢神経系における NgR1-3、Nogo-A、MAG、OMgp の発現分布に関する報告は散見されるが、それらは限られた領域における研究であり、結果も必ずしも一定していない。そこで本研究ではラット中枢神経系における NgR1-3、Nogo-A、MAG、OMgp の mRNA 発現分布を広範かつ詳細に検討し、これらの因子の軸索再生阻害に対する機能的関与を明らかにすることを目的とした。

7 週齢 Wistar 系雄性ラットより脳、脊髄を採取、凍結後、20 μ m の厚さの冠状切片を作成した。NgR1-3、Nogo-A、MAG、OMgp の各 mRNA を特異的に認識する[35S]dATP 標識オリゴヌクレオチドプローブを用いて in situ hybridization を行い、脳の全領域での発現分布を検討した。

Nogo-A mRNA は脳全体の灰白質、白質に広く発現しており、ニューロンやオリゴデンドロサイトにとって必須のタンパクであると考えられた。MAG と OMgp の mRNA はいずれも脳梁や内包などの白質に強く発現しており、明視野による観察でオリゴデンドロサイトに発現していることが明らかとなった。

一方、NgR1-3 mRNA の発現は終脳、間脳、小脳などの灰白質に限局して認められ NgR1-3 mRNA の発現パターンは多様であった。特徴的なパターンとして、NgR1-3 mRNA の全ての発現が見られる領域は海馬の錐体細胞や大脳皮質の錐体細胞などのいわゆる投射ニューロンであった。これらの投射ニューロ

ンでは軸索再生を制限することにより正確な投射を維持しているものと考えられる。これに対し、NgR1-3 mRNA のいずれの発現も見られない領域としては海馬の介在ニューロン、脳幹のモノアミン作動性ニューロン、視床網様核の GABA ニューロンがあげられる。これらのニューロンは高い再生能があることが知られていることから、軸索再生が NgR1-3 の発現の有無により調節されていることが示唆された。

現在のところ NgR1-3 の機能の全てが明らかになったわけではなく、また NgR1-3 と Nogo-A、MAG、OMgp のレセプター／リガンドの組み合わせによる機能の違いも研究段階である。今後、これらの点が明らかになることにより、中枢神経系の発達や再生メカニズムの解明など神経科学的発展に寄与するのみならず、中枢神経障害などの治療への臨床的貢献も期待される。

審査委員会では申請者らが *in situ* hybridization 法を用い NgR1-3、Nogo-A、MAG、OMgp の mRNA 発現分布を中枢神経全域において広範かつ詳細に検討し、その発現パターンの組み合わせにより神経の可塑性のメカニズムの一部を解明したことを高く評価した。本研究の結果は現在最も注目をあびている中枢神経の再生医療において新たなページを開くものであり、今後更なる研究の発展を期待したい。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 軸索再生阻害の生物学的理由について
- 2) NgR1 及び Nogo-A の他臓器での発現について
- 3) NgR1 は脳の外傷や虚血で変化するか
- 4) NgR1 は脳の発生や老化で変化するか
- 5) 霊長類における NgR1 の発現について、
- 6) 後根神経節における NgR1 の発現について
- 7) NgR1 -3 の軸索内での分布について
- 8) オリゴヌクレオチドプローブの結合部位について
- 9) 末梢神経での Nogo-A、MAG、OMgp の発現について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	難波 宏樹	
	副査	堀内 健太郎	宮嶋 裕明